

B12 8919655

ISSN 0101-3084

**CNEN/SP**

---

**ipen** Instituto de Pesquisas  
Energéticas e Nucleares

ESTUDOS ULTRAESTRUTURAIS DE EMBRIÃO DE *Biomphalaria*  
*glabrata* (SAY, 1818)

Olivia Kimiko Kikuchi, Kayo Okazaki, Toshie Kawano e Albertc Augusto Gonçalves de  
Freitas Castro Ribeiro

PUBLICAÇÃO IPEN 203

SETEMBRO/1988

SÃO PAULO

**ESTUDOS ULTRAESTRUTURAIS DE EMBRIÃO DE *Biomphalaria*  
*glabrata* (SAY, 1818)**

**Olivia Kimiko Kikuchi, Kayo Okazaki, Toshië Kawano e Alberto Augusto Gonçalves de  
Freitas Castro Ribeiro**

**DEPARTAMENTO DE APLICAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CNEN/SP  
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES  
SÃO PAULO – BRASIL**

**Série PUBLICAÇÃO IPEN**



**INIS Categories and Descriptors**

**C00**

**EMBRYOS**

**FINE STRUCTURE**

**SNAILS**

---

**IPEN - Doc - 3071**

**Aprovado para publicação em 04/08/88.**

**Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).**

## ESTUDOS ULTRAESTRUTURAIS DE EMBRIÃO DE Biomphalaria glabrata (SAY,1818)\*

Olivia Kimiko Kikuchi, Kayo Okazaki, Toshie Kawano<sup>1</sup> e Alberto Augusto Gonçalves de Freitas Castro Ribeiro<sup>2</sup>

### RESUMO

Os estudos ultraestruturais de embriões de Biomphalaria glabrata (Mollusca: Gastropoda), um importante caramujo vetor da esquistossomose não tem sido explorados. No presente trabalho foi avaliada a técnica mais adequada para o processamento dos embriões para a microscopia eletrônica. A técnica que forneceu resultados bastante promissores foi a fixação dupla em glutaraldeído 1% mais tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 M (pH 7,4) a 49 C, pré-contraste em acetato de uranila 1% durante uma noite e a embebição tanto em resina EPON como Polyilite sob vácuo. Foram utilizados embriões no estágio de trocófora jovem que se caracteriza pela intensa organogênese. Alguns aspectos da ultraestrutura de células embrionárias de B. glabrata são apresentados.

### ULTRASTRUCTURAL STUDIES OF Biomphalaria glabrata (SAY,1818) EMBRYO

### ABSTRACT

Ultrastructural studies of Biomphalaria glabrata embryos (Mollusca: Gastropoda), an important snail vector of schistosomiasis has not been explored. In the present work it was evaluated a suitable electron microscopical technique for embryos processing. Promising results was obtained with double fixation in 1% glutaraldehyde plus 1% osmium tetroxide in 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.4), preliminary staining over night in 1% uranyl acetate and embedding in EPON or Polyilite under vacuum. It was used embryos at young trochophore stage wich is characterized by active organogenesis. Some ultrastructural aspects of B. glabrata embryos cells are presented.

### INTRODUÇÃO E OBJETIVO

Entre as nove espécies brasileiras conhecidas de caramujos de água doce do gênero Biomphalaria, a Biomphalaria glabrata figura como um im-

(\*) Trabalho apresentado na XL Reunião Anual da SBPC, realizada em São Paulo no período de 10 a 16 de julho de 1988.

(1). LEZEP - Instituto Butantan

(2). Depto. de Biologia do Instituto de Biociências - USP

portante vetor da esquistossomose no Brasil, juntamente com as outras espécies, B. tenagophila e B. straminea. Os estudos intensos em torno desses caramujos se devem ao fato de ainda não se saber por que somente algumas espécies são hospedeiras potenciais do Schistosoma mansoni. Na tentativa de desvendar esse problema, surgiram os mais diversos estudos abrangendo os aspectos biológicos, epidemiológicos, comportamentais, ecológicos, embriológicos, citogenéticos etc. Em 1956, Luís Rey<sup>(10)</sup> relatou como uma das soluções para combater a esquistossomose no nosso país, o melhoramento do saneamento básico e da qualidade de vida da população, que segundo ele não seria possível de se realizar na época. Passados mais de trinta anos, essas providências ainda não foram tomadas e continua-se tentando combater o molusco transmissor da doença que afeta cerca de 200 milhões de pessoas em mais de 70 países<sup>(6)</sup>. A descoberta de um moluscicida eficiente depende evidentemente do conhecimento que se tem da biologia desses caramujos. Várias tentativas tem sido feitas utilizando-se, por exemplo, diversos produtos químicos com ação moluscicida, embora os resultados obtidos sejam pouco promissores. A possibilidade de utilização da radiação ionizante como uma ferramenta para o controle biológico de B. glabrata foi levantada por Perlowagora-Szumlewicz e Berry<sup>(9)</sup>. Entretanto, são necessárias investigações mais acuradas, se levarmos em consideração o modo de reprodução desses animais que são hermafroditas, podendo garantir a produção de uma geração mesmo restando somente um exemplar isolado. Além disso, são resistentes às grandes oscilações ambientais. Okazaki e Kawano<sup>(7,8)</sup> constataram uma radiosensibilidade relativamente alta dos embriões de B. glabrata, quando submetidos a ação da radiação gama de Cobalto-60. A intensidade do dano da radiação foi dependente da idade do embrião no momento da irradiação e da dose aplicada.

Os estudos ultraestruturais de ovos e embriões de moluscos são pouco explorados. Podemos mencionar no entanto, os trabalhos de Elbers<sup>(3)</sup> em Limnaea stagnalis e de Dohmen e Lok<sup>(2)</sup> em Crepidula fornicata. Quanto a B. glabrata, somente a sua gametogênese é conhecida ultraestruturalmente<sup>(4,5)</sup>.

O desenvolvimento embrionário de B. glabrata é relativamente curto, de cerca de uma semana e foi analisado mais detalhadamente somente em 1970 por Camey e Verdonk<sup>(1)</sup>. Os estádios embrionários compreendem fases

de primeira clivagem do ovo, blástula, gástrula, trocófora jovem, trocófora e veliger. A trocófora jovem representa o primeiro estágio larval e é caracterizada pelo início da movimentação do embrião dentro da cápsula do ovo, graças à presença de células ciliadas do prototroco. É nesse estágio de desenvolvimento que ocorre a intensa organogênese.

O enfoque do nosso estudo consiste na análise ao nível ultraestrutural dos possíveis efeitos biológicos causados pela radiação ionizante sobre embriões de caramujo Biomphalaria glabrata. O presente trabalho compreende portanto, a etapa preliminar do estudo, que consiste em estabelecer a técnica mais adequada para a preparação do material biológico para a microscopia eletrônica. Somente após o estabelecimento da técnica e o conhecimento profundo da ultraestrutura do embrião normal é que será possível realizar testes utilizando a radiação.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Desovas de Biomphalaria glabrata foram coletadas de uma criação de caramujos mantida há vários anos em condições de laboratório. Cada desova contém vários embriões que são envoltos individualmente por uma cápsula de ovo que mede cerca de 1 mm de diâmetro maior. Os embriões no estágio de trocófora jovem (com 48 - 54 horas após a primeira clivagem do ovo, a 25° C) foram selecionados e decapsulados sob um estereomicroscópio em uma solução de glutaraldeído 1% em tampão cacodilato 0,05 M (pH 7,4).

Foi feito um teste com pré e pós-fixação em glutaraldeído 1% (2 horas), seguido de tetróxido de ósmio 1% (40 minutos), em tampão cacodilato, a 4° C e outro com fixação dupla em glutaraldeído 1% mais tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão a 4° C, durante 2 horas. Após várias lavagens em tampão cacodilato, os embriões ou foram diretamente desidratados em série alcoólica ou imersos em uma solução de acetato de uranila 1% por uma noite a 4° C, para serem submetidos posteriormente à desidratação.

Dois tipos de resina para a emblocagem do material foram utilizados: EPON 812 e Polylyte 8001. A embebição dos embriões foi feita gradativamente em resina pura diluída em óxido de propileno ou acetona. A etapa final da embebição, em resina pura, ocorreu em condições ambientais

ou sob vácuo.

O material foi finalmente emblocado em cápsula de gelatina, sendo colocado somente um embrião por cápsula. A polimerização da resina foi feita a 65° C, durante 3 a 4 dias. Foi utilizado um Pyramitone LKB para a trimgem dos blocos e os cortes ultrafinos foram obtidos em um ultramicrotomo LKB.

Os cortes foram contrastados com acetato de uranila e/ou citrato de chumbo. As observações foram realizadas em um Microscópio Eletrônico Carl Zeiss EM 9S ou Siemens Elmiskop IA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica que apresentou uma melhor preservação da ultraestrutura celular do embrião de Biomphalaria glabrata foi a fixação dupla em glutaraldeído 1% mais tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 M (pH 7,4), pré-contraste em acetato de uranila 1% durante uma noite a 49° C e a embebição em resina pura sob vácuo.

A Figura 1 apresenta o aspecto geral da região periférica do embrião no estágio de trocófora jovem. Observa-se que as células apresentam um núcleo relativamente grande com um nucléolo evidente, várias mitocôndrias com número relativamente pequeno de cristas, citoplasma repleto de polissomos livres e pobre em retículo endoplasmático rugoso.

A Figura 2 mostra as células ciliadas do prototroco que dará origem ao futuro órgão de locomoção do caramujo adulto. Pode-se observar vários cílios cortados tanto longitudinalmente como transversalmente e alguns implantados na membrana plasmática.

Frequentemente foram observadas várias células apresentando uma quantidade relativamente grande de grânulos de vitelo em diferentes estágios de maturação, como pode ser observado na Figura 3. Jong-Brink et al.<sup>(4)</sup> sugeriram que o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático rugoso podem estar envolvidos na formação do vitelo pela produção de pequenas vesículas contendo material vetelínico, em oócitos de Biomphalaria glabrata. Constataram que o conteúdo dos grânulos consiste de proteínas, íon férrico, fosfolípídeos e/ou lipoproteínas, RNA, fosfatase ácida e esterase. Em Limnaea stagnalis, grânulos de vitelo foram observados em oócitos<sup>(11)</sup> e em embriões no estágio de quatro células<sup>(3)</sup>.



Figura 1. Aspecto geral da ultraestrutura da região periférica do embrião de Biomphalaria glabrata, no estágio de trocófora jovem. N = núcleo; Nu = nucléolo; M = mitocôndria; p = polisomos. 7.200 x.





Figura 2. Eletromicrografia das células ciliadas do prototroco. Cl = cílios cortados longitudinalmente; Ct = cílios cortados transversalmente; Ci = cílios implantados na membrana plásmatica ; M = mitocôndria; G = complexo de Golgi; RER = retículo endoplasmático rugoso; p = polissomos; v = vesículas. 18.800 x.

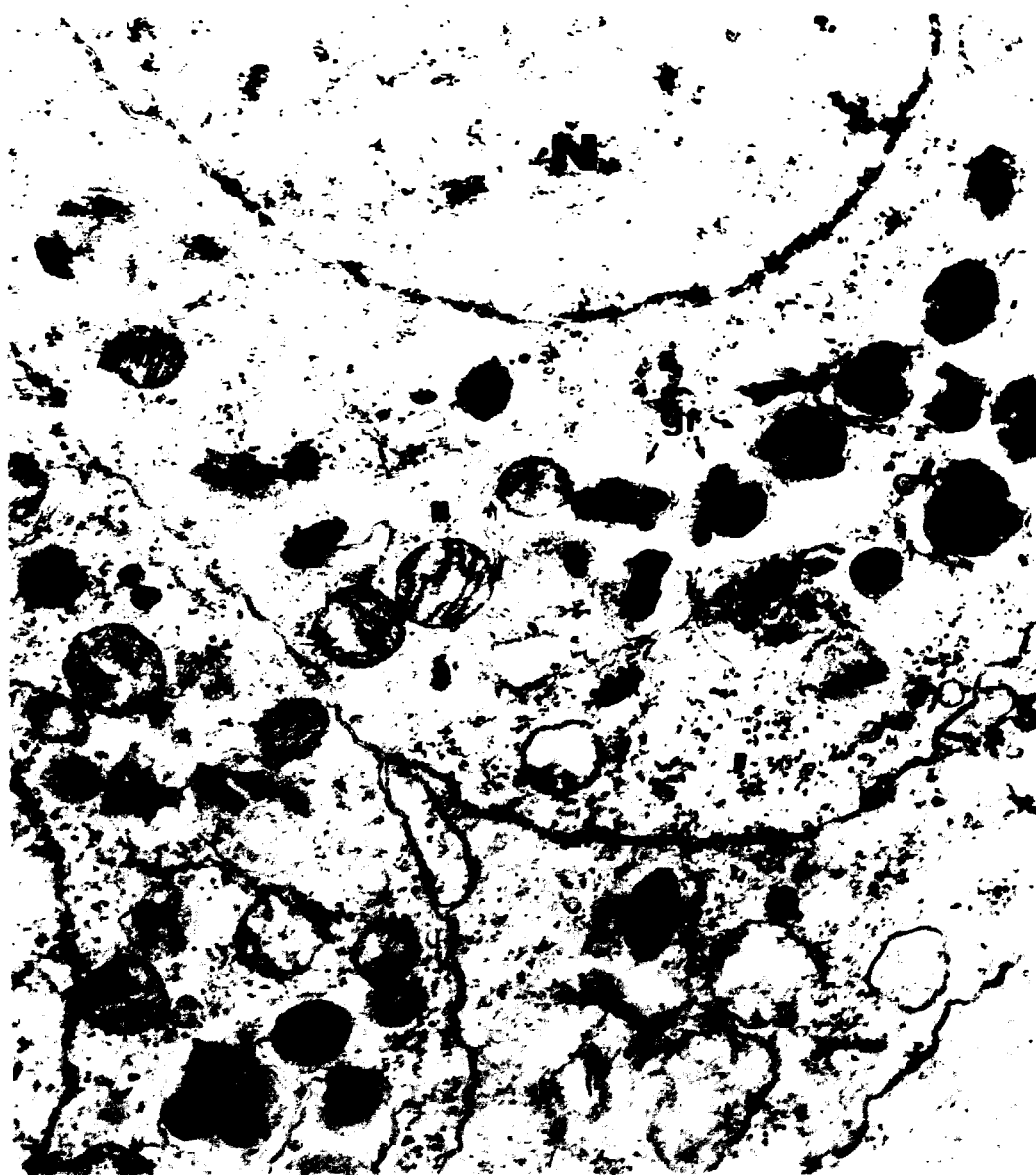


Figura 3. Eletromicrografia mostrando células embrionárias, com vários grânulos de vitelo (gr) em diferentes estágios de maturação .  
N = núcleo; M = mitocôndria; p = polissomos. 18.800 x.



Figura 4. Eletromicrografia mostrando um feixe de microtúbulos (MT) conectando células adjacentes. N = núcleo; M = mitocôndria; Cv = corpo multivesicular; p = polissomos; v = vesículas. A seta indica ribossomos aderidos à membrana externa do envoltório nuclear. 18.800 x.

É interessante notar na Figura 4, a presença de um feixe de microtúbulos conectando células adjacentes. Na mesma figura, pode-se verificar vários ribossomos associados à membrana externa do envoltório nuclear, polissomos, mitocôndrias e pequenas vesículas esparsos no citoplasma e a ocorrência de corpo multivesicular.

#### AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos aos técnicos Waldir Caldeira e Márcio Valentin da Cruz, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências / USP, pelo auxílio prestado no treinamento técnico em microscopia eletrônica. Este trabalho resultou do convênio estabelecido entre o Departamento de Biologia do Instituto de Biociências/USP e a Divisão de Radiobiologia - Departamento de Aplicações em Ciências Biológicas do IPEN - CNEN/SP.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. CAMEY, T. & VERDONK, N.H. The early development of the snail Biomphalaria glabrata (Say) and the origin of the head organs. Neth. J. Zool., 20 (1):93-121, 1970.
02. DOHMEN, M.R. & LOK, D. The ultrastructure of the polar lobe of Crepidula fornicata. J. Embryol. Exp. Morphol., 34(2):419-38, 1975.
03. ELBERS, P.F. The primary action of lithium chloride morphogenesis in Limnaea stagnalis. J. Embryol. Exp. Morphol., 22 (3):449-63, 1969.
04. JONG-BRINK, M.; WIT, A.; KRAAL, G.; BOER, H.H. A light and electron microscope study on oogenesis in the freshwater pulmonate snail Biomphalaria glabrata. Cell. Tissul. Res., 171:195 - 219, 1976.
05. JONG-BRINK, M.; BOER, H.H.; HOMMES, T.G.; KODDE, A. Spermatogenesis

- and the role of Sertoli cells in the freshwater snail, Biomphalaria glabrata. Cell. Tiss. Res., 181:37-58, 1977.
06. MARSTON, A. & HOSTEITMANN, K. Plant molluscicides Phytochemistry, 24 (4):639-52, 1985.
07. OKAZAKI, K. & KAWANO, T. Efeito da radiação gama de Cobalto-60 sobre o embrião de Biomphalaria glabrata (Say, 1818). I. Mortalidade e eclosão. Cienc. Cult. 38 (7):800, 1986. (Resumos da 38ª Reunião Anual da SBPC, Curitiba, PR).
08. OKAZAKI, K. & KAWANO, T. Efeito da radiação gama de Cobalto-60 sobre o embrião de Biomphalaria glabrata (Say, 1818). II. Malformação. Cienc. Cult., 38 (7):769, 1986. (Resumos da 38ª Reunião Anual da SBPC, Curitiba, PR).
09. PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. & BERRY, E.G. Effects of ionizing radiation on Australorbis glabratus eggs. Exp. Parasitol., 15:226-31, 1964.
10. REY, L. Contribuição para o conhecimento da morfologia, biologia e ecologia dos Planorbídeos brasileiros transmissores da esquistossomose. Sua importância em epidemiologia. Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956.
11. RIGBY, J.E. The fine structure of the oocyte and follicle cells of Limnaea stagnalis, with special reference to the nutrition of the oocyte. Malacologia, 18:377-80, 1979.